Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003, 69:

Bases moleculares de la apoptosis

MARÍA CASCALES ANGOSTO
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Introducción

La muerte celular programada es un proceso celular fundamental que es esencial para el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. Esta forma de muerte celular o apoptosis se realiza mediante la activación de un programa intrínseco y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. Las señales que desencadenan la apoptosis incluyen, daño celular causado por radiaciones ionizantes, infección vírica o señales extracelulares. En el programa de suicidio celular interviene la transcripción de genes específicos y su traducción, lo cual permite suprimir tal suicidio inhibiendo tanto la transcripción como la traducción. Estos hechos demuestran que la muerte celular programada o apoptosis está mediada por mecanismos celulares intrínsecos.

La apoptosis implica una programación genética de la célula que promueve una cascada dependiente de energía de cambios morfológicos y bioquímicos en el interior de la célula que conducen a su muerte y eliminación

La mayor parte del conocimiento que hoy tenemos de la genética molecular de la apoptosis proviene de investigaciones sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans.* Se trata de un nematodo hermafrodita, cuyo ejemplar adulto, de 1 mm de longitud, se forma a partir de 1090 células somáticas de las cuales 131 mueren por apoptosis. En este gusano se han observado cuatro fases en la apoptosis: decisión si una célula ha de morir; muerte; fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos y degradación de los cuerpos fagocitados.

Necrosis y Apoptosis

A nivel cellular existen dos formas de morir: por necrosis o por apoptosis. Por necrosis mueren las células accidentalmente cuando son lesionadas por agresión mecánica o tóxica. Por apoptosis mueren las células cuando son inducidas a suicidarse

En la muerte por necrosis se detectan una serie de cambios característicos:

- Las células y sus orgánulos se hinchan porque se altera la capacidad de la membrana plasmática para controlar el paso de los iones y el agua;
- las células se rompen y su contenido se vierte al espacio intercelular;
- se origina inflamación de los tejidos adyacentes.

Las células que son inducidas a sufrir apoptosis o suicidio celular presentan las características siguientes:

- reducen su tamaño,
- sus mitocondrias se abren y dejan salir el citocromo c,
- en la superficie celular surgen una especie de vejigas
- se degrada la cromatina (DNA y proteínas) de sus núcleos

- se rompen en fragmentos rodeados de membrana, denominados cuerpos apoptóticos
- La fosfatidil serina, fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana, se expone en la superficie
- La fosfatidil serina se une a receptores de las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que fagocitan los cuerpos apoptóticos
- Las células fagocíticas segregan citoquinas que inhiben la inflamación (Figura 1)

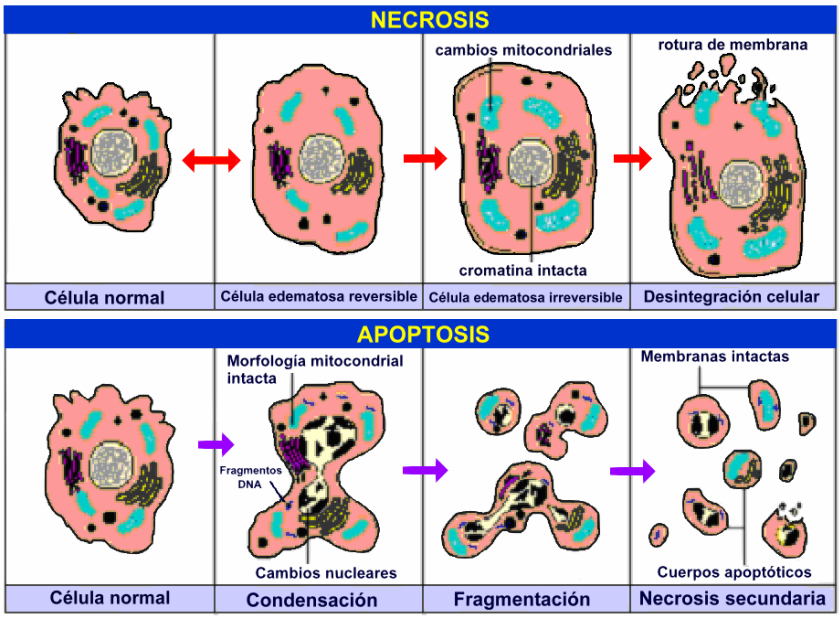

Figura 1.- Diferencia entre necrosis y apoptosis

En la muerte por apoptosis, la serie de acontecimientos sucede de manera tan ordenada, que este proceso de suicidio celular se denomina muerte cellular programada. Pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis:

Fase efectora, adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{++} intracelular**,** que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas -caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular.

Fase degradativa, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el DNA, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.

Fase de eliminación, los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas.

Existen dos razones diferentes para explicar por qué las células mueren por apoptosis: La eliminación de células en exceso y la eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo

Ejemplos de eliminación de células en exceso:

- La reabsorción de la cola de los renacuajos
- La eliminación de las membranas interdigitales en la formación de los dedos en el feto.
- Para llegar al estado adulto el nematodo el *C.elegans* tiene que perder por apoptosis 131 células
- La eliminación del endometrio al iniciarse la menstruación
- La formación de las sinapsis entre neuronas en cerebro requiere la eliminación por apoptosis de una serie de células.

Ejemplos de eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo

- *Células infectadas con virus,* son destruidas por los linfocitos T citotóxicos.
- *Células del sistema inmune.* Después de la respuesta inmune, las células efectoras han de ser eliminadas para prevenir que ataquen a los constituyentes propios del organismo. Los linfocitos T citotóxicos inducen la apoptosis en cada una de las distintas células del sistema inmune e incluso en ellas mismas. Cualquier defecti en la maquinaria apoptótica de estas células inmunes, se encuentran asociados con enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematosus o la artritis reumatoide.
- *Células con DNA lesionado*. La lesión en su genoma hace que las células puedan llegar a desarrollar cáncer. Las células responden a la lesión al DNA incrementando la producción de p53, un poderoso inductor de la apoptosis. Las mutaciones en p53 producen una proteína defectiva que a menudo se detecta en células cancerosas
- *Células cancerosas.* La radioterapia y la quimioterapia inducen la apoptosis en algunos tipos de cáncer.

Inducción de la apoptosis

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales positivas están los factores del crecimiento y las hormonas. En ciertos tipos de células hematopoyéticas, el crecimiento y la supervivencia depende del la presencia continua de factores del crecimiento (CSF, factores estimuladoresde colonias), y la eliminación de ellos conduce irremediablemente a la apoptosis en lugar de a la cesación del crecimiento.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del DNA por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, etc.; moléculas que se unen a receptores específicos

en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el TNFα que se une al TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas, denominado también CD95, etc.

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas, verdaderas guillotinas moleculares, son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y que se procesan a estado activo por proteolisis. Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteolisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y presentan las características siguientes:

1. son cisteína proteasas específicas de aspartato porque tienen cisteína como grupo nucleofílico para la rotura del sustrato y tienen un requerimiento específico por el residuo aspartato (D) de sus sustratos que los rompen en los enlaces D-X,
2. son sintetizadas como procaspasas que adquieren su actividad por proteolisis,
3. efectúan la proteolisis en una serie específica de sustratos, proceso que es irreversible y,
4. las caspasas y sus inhibidores siempre coexisten en las células normales, lo cual previene de una activación accidental que supondría una muerte innecesaria de células normales.

Las procaspasas (30-50kD) contienen tres dominios: un prodominio N- terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas de mamíferos. En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos: El grupo *inflamatorio* que comprende a las caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14, el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas -2, -8, -9, -10, y el grupo *efector o ejecutor* de la apoptosis que incluye a las restantes

Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen prodominios largos, excepto para la 14 que no lo tiene o lo tiene muy corto. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD); y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores y juegan importantes papeles en la activación de las procaspasas. Por el contrario, los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es probable que puedan mediar interacciones entre proteínas.

Ha sido determinada la estructura tridimensional de las caspasas -1, -3, y –8: Se componen de dos heterodímeros (p10 -p20) que se unen para formar un tetrámero dispuesto en dirección opuesa, con las dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las dos subunidades grandes. Cada heterodímero contiene un sitio activo al que contribuyen las dos subunidades con residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis (figure 2).

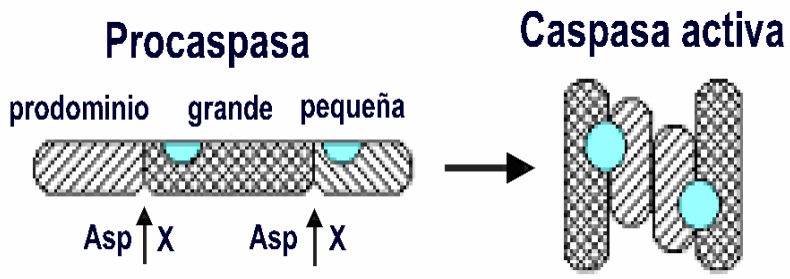

Figura 2. Activación of procaspasas. Procaspasa contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad grande y otra pequeña. La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes.

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo las misiones siguientes:

- cortar contactos con células vecinas,
- reorganizar el citoesqueleto,
- activar las endonucleasas (fragmentación del DNA),
- desmantelar las láminas nucleares (condensación),
- expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina), y
- activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas.

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el DNA. Estas dos vías, también denominadas extrínseca e intrínseca, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente.

La vía intrínseca, requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo y smac/diablo. El citocromo c funciona uniéndose a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas, mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por las acciones opuestas de los miembros de la familia Bcl-2. Las proteínas multidominios proapoptóticas Bcl-2, como Bax y Bak , pueden activarse directamente por interacción con la proteína Bid que posee solo el dominio BH3. Alternativamente, la unión de otras proteínas apoptóticas, solo BH3, como Noxa, Puma, Bad y Bim a las antiapoptóticas Bcl2 y BclXL, origina la inactivación de Bax y Bak. La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras o ejecutoras y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

La extrínseca se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (FAS, TNFR, TRAIL, etc) para activar a las caspasas iniciadoras (caspasas-9 y –10), que a su vez, activan por proteolisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas-3 y –7. Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) que afecta a las caspasas iniadoras y a las ejecutoras.

Apoptosis desencadenada por señales internas: vía intrínseca o mitocondrial

La apoptosis inducida por señales intrínsecas o apoptosis inducida por estrés, se inicia en la mitochondria con la salida del citocromo c. Los mecanismos de lesión mitocondrial en respuesta a diferentes situaciones de estrés es un tema que se encuentra en debate. Sin embargo, la activación de Bax, mediada por p53, parece que en la actualidad está ganando adeptos, y puede servir como paradigma para explicar la alteración mitocondrial activada por estrés. Bax se ha demostrado que se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC), que se forma por el transportador de adenín nucleótido (ANT), el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje (VACN) y la ciclofilina D. El poro MPTPC participa en la regulación del calcio, el pH, el potencial de la membrana ($\Delta\Psi_m$), y el volumen mitocondrial y funciona como un canal aniónico. Se ha demostrado que la proteína proapoptótica Bax puede inducir la apertura del poro al formar un complejo con ANT que se localiza en la membrana interna mitocondrial. La apertura del poro trae consigo un descenso en $\Delta\Psi_m$ y la salida de factores apoptóticos entre los que se incluye:

1. el citocromo c, que desencadena la activación de las caspasas,
2. el smac/diablo, que bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP) y
3. el factor inductor de la apoptosis (AIF) que estimula la apoptosis a nivel nuclear independientemente de las caspasas.

La salida al citosol del citocromo c desencadena la apoptosis vía caspasa-9 y Apaf-1. Sin embargo, se han descrito muy recientemente va-

rios modelos alternativos para explicar la apoptosis mitocondrial. Por ejemplo, se ha demostrado que la salida del citocromo c puede ocurrir en momentos previos a la apertura del poro de permeabilidad transitoria y a la pérdida del potencial de membrana, y que Bax puede promover esta salida sin implicar al poro.

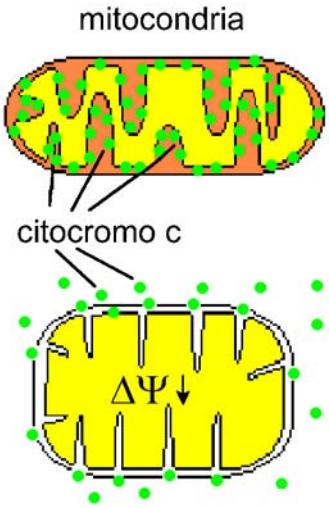

Figura 3. Salida del citocromo c de la mitochondria por apertura del poro de permeabilidad transitoria.

En una célula sana la membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 en su superficie. Bcl-2 se une a una molécula de proteína denominada Apaf-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas). De esta manera Apaf-1 se mantiene en forma inactiva. Cualquier alteración del equilibrio interno de la célula, por ejemplo elevación de las especies reactivas de oxígeno, causa que la mitocondria libere citocromo c. A su vez Bcl-2 deja libre a Apaf-1 que se une al citocromo c

La salida de la mitocondria señala un nuevo papel para el citocromo c. Dentro de la mitocondria en la cadena de transporte electrónico, el citocromo c se encuentra generando energía necesaria para la vida de la célula. Fuera de la mitocondria el mismo citocromo c es un activador de

muerte. El objetivo citosólico del citocromo c es el homólogo del CED-4, el Apaf-1 (Figura 3).

El citocromo c en el citosol se une al terminal C del Apaf-1 en la región que contiene múltiples motivos WD-40. Esta unión facilita la unión del dATP a Apaf, la molécula se abre y expone una superficie de oligomerización. Apaf-1 oligomeriza lo cual va acompañado por un reclutamiento simultáneo de procaspasa-9 al motivo CARD del terminal N de Apaf-1. Parece ser que la activación de la caspasa-9 dentro del complejo apoptosoma se consigue mediante proteolisis autocatalítica.

Estudios de filtración sobre gel revelan que el Apaf-1 se incorpora a un complejo de elevado peso molecular después de activarse mediante la adición del citocromo c y dATP a su molécula. El Apaf-1 monomérico tiene un peso molecular de 130 kD. No está aún claro el número de monómeros Apaf-1 que oligomerizan. En la figura se muestra un heptámero. Se sabe que la relación entre las moléculas de procaspasa-9 y Apaf-1 es de 1:1, pero se desconoce la relación entre el Apaf-1 y el citocromo c.

Se sugiere que Apaf-1 es un regulador alostérico de la caspasa-9, ya que uno y otra funcionan como subunidades de un holoenzima, el apoptosoma, en el que la capacidad de las moléculas de Apaf-1 limita la actividad proteolítica de la caspasa-9. La procaspasa-9 sufre una autoproteolisis, se vuelve activa y activa, a su vez, a otras caspasas. La activación secuencial de una caspasa por otra, crea una cascada expansiva de actividad proteolítica, que conlleva la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, la degradación del DNA cromosómico y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

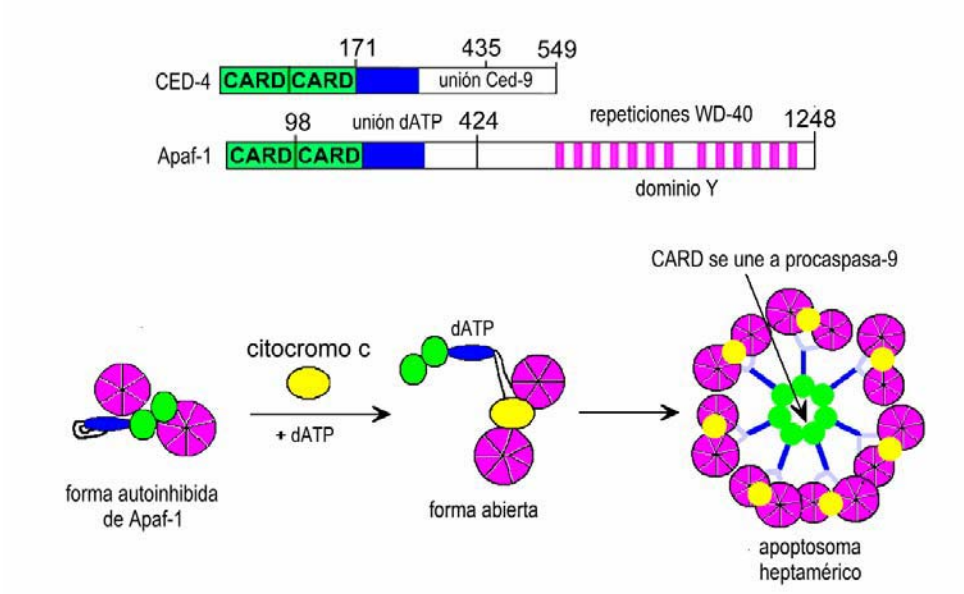

Figura 4. Formación del apoptosoma. El Apaf-1, factor activador de proteasas apoptóticas, está formado por tres dominios: dominio CARD o de reclutamiento de caspasas, dominio de unión al dATP y dominio Y de repeticiones WD-40. En condiciones normales se encuentra en el citosol en forma inerte. Una vez recibidas por la célula las señales de muerte, el citocromo sale de la mitocondria. Al unirse el citocromo c y el dATP a la molécula de Apaf-1, ésta se activa y se abre dejando al exterior la superficie de oligomerización. Varias unidades Apaf-1 se unen formando el apoptosoma. En esta figura son siete moléculas de Apaf-1 que se han unido dejando la zona CARD en el centro que es donde va a unirse el prodominio N-terminal de las procaspasas-9

Apoptosis desencadenada por señales externas: vía extrínseca mediada por receptor

Después de la activación de un receptor de los denominados de muerte, la proteína adaptadora FADD media la inmediata activación de la caspasa-8 (caspasa iniciadora). La caspasa-8 una vez activada, desencadena su vez, la activación de otras caspasas, entre las que se incluye la caspasa-3 (caspasa ejecutora). Sin embargo, paralelamente, la caspasa-8 puede activar la via apoptótica mitocondrial al activar la proteína Bid, la cual puede promover la salida del citocromo c de la mitocondria y activar

la caspasa-9. Al igual que la caspasa-8, la caspasa-9 iniciadora activa a las caspasas ejecutoras.

Los receptores de muerte más conocidos son eL Fas y el TNFR1 (receptor TNF). Son proteínas transmembrana con sus dominios receptores expuestos en la superficie de la célula (figura 6). La unión de un activador complementario o ligando, FasL y TNF (factor de necrosis tumoral), respectivamente, transmite una señal al citoplasma que conduce a la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 al igual que la caspasa-9 inicia una cascada amplificadora de activación que conduce al desmantelamientoi celular, a la formación de cuerpor apoptóticos y a la fagocitosis de la célula.

Son estos, por tanto, receptores de la superficie celular que transmiten las señales apoptóticas que se inician por unión del ligando específico. Estos receptores juegan un papel importante en la apoptosis ya que pueden activar la cascada de caspasas en pocos segundos después de la unión de ligando y receptor. Los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF) poseen generalmente otras funciones además de la de ser apoptogénicos. Los mejores caracterizados son el FAS o CD95, el TNFR-1 y los TRAIL DR4 y DR5

La señalización por el TNRF-1 se produce en células T activadas por macrófagos en respuesta a infección. La unión de TNFa al TNFR-1 da lugar a la trimerización del receptor y a la agrupación de dominios intracelulares. Esto permite la unión de una molécula adaptadora denominada TRADD.

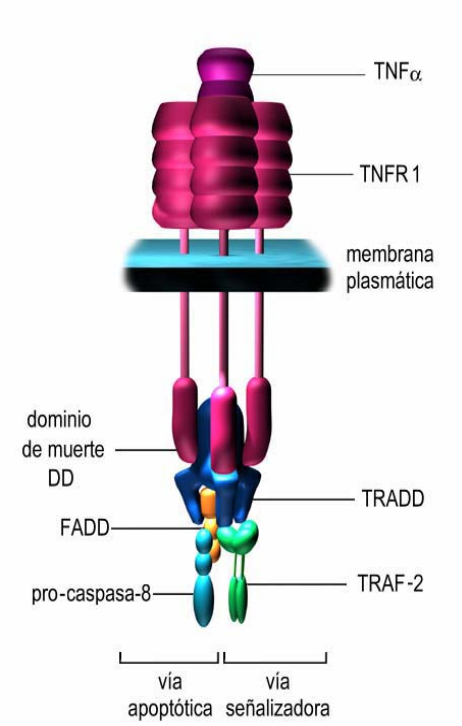

Figura 5. Señalización de la apoptosis por el receptor TNFR1

El factor TNF se produce por las células T y por los macrófagos activos en respuesta a la infección. La unión del TNF al TNFR1 ejerce diversos efectos (Figura 5). El efecto señalizador conduce a la activación de los factores de transcripción NFκB y AP-1 lo que conlleva a la inducción de una serie de genes proinflamatorios e inmunomoduladores. En algunas células, sin embargo, el TNF puede inducir la apoptosis.

La unión de TNFα a su receptor TNFR1 origina la trimerización del receptor y el agrupamiento de dominios de muerte intracelulares. Esto permite la unión de un adaptador intracelular denominado TRADD o dominio de muerte asociado al TNFR, vía interacciones entre los dominios de muerte. El dominio TRADD posee la capacidad de reclutar una serie de proteínas diferentes en el receptor activo. La unión de TRAF2 o factor asociado al TNF origina la activación de la vía NFκB y JNK/Ap1.

El dominio TRADD puede también asociarse con FADD y de esta manera se induce la apoptosis mediante el reclutamiento y rotura de la procaspasa-8.

Cuando las células T citotóxicas reconocen la célula objetivo (infectada), producen el ligando Fas (FasL) en su superficie. Éste ligando se une al receptor Fas en la superficie de la célula infectada, conduciéndola a la muerte por apoptosis. Las etapas tempranas en la apoptosis son reversibles. En algunos casos, la destrucción final de la célula solo puede ser garantizada después de su fagocitosis (Figura 6)

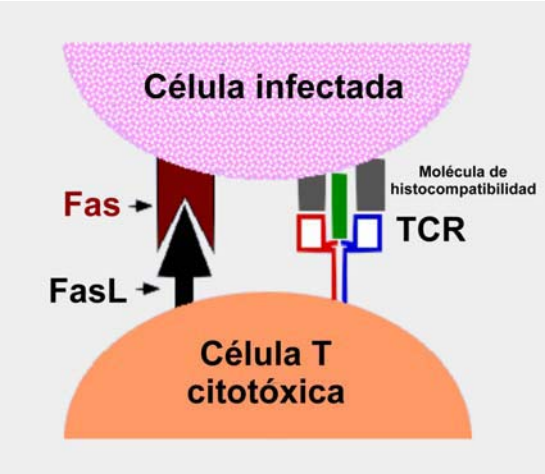

Figura 6.- Vía utilizada por las células T citotóxicas para inducir la apoptosis en células infectadas.

La señalización por el receptor Fas se verifica en estos tres casos:

- muerte de las células infectadas mediada por células T citotóxicas;
- deleción de células T activas al final de la respuesta inmune y
- destrucción de células inflamatorias e inmunes en sitios inmunes privilegiados.

La activación de la apoptosis a través de la señalización por FasL se verifica de manera similar a la del TNF. El ligando Fas (FasL) es un

trímero que en asociación con el receptor Fas promueve su trimerización que, a su vez, origina un agrupamiento intracelular de partes del receptor denominadas dominios de muerte (DD, death domains. Esto permite que una proteína adaptadora FADD (Fas-associated death domain) se asocie con el receptor mediante una interacción entre dominios de muerte homologos sobre el receptor y sobre FADD. Además de contener un DD, FADD contiene un dominio efector de muerte (DED, death effector domain). Este permite la union de la procaspasa-8. La pro-caspasa-8 se asocia al DED de FADD y se rompe para producir la caspasa-8 activa.

Factor inductor de la apoptosis (AIF)

Se ha clonado una molécula nueva asociada con la apoptosis denominada factor inductor de la apoptosis (AIF). Al igual que el citocromo c, AIF se localiza en la mitocondria y sale de ella en respuesta a un estímulo de muerte. Se ha demostrado recientemente que la inactivación genética de AIF vuelve a las células embrionarias resistentes a la muerte celular inducida por privación de suero (factores de supervivencia). Además, el AIF es esencial para la apoptosis en la morfogénesis del ratón. La muerte celular dependiente del AIF muestra características típicas de la apoptosis y puede ser desacoplada genéticamente de la expresión de Apaf1 y caspasa-9.

El AIF es una proteína que reside normalmente en el espacio intermembranal de la mitochondria. Este factor de 57 kD, posee una secuencia de aminoácidos que presenta homología con la ferredoxina bacteriana y con las NADH-oxidoreductasas. Procede de un propeptido de 67 kD que contiene una secuencia de localización mitocondrial entre sus 120 primeros aminoácidos. El AIF maduro contiene un MLS putativo (secuencia de localización mitocondrial). Cuando la célula recibe una señal o mediante la inducción de la apoptosis con estaurosporina, el AIF sale de la mitochondria, del mismo modo que el citocromo c, y se dirige al núcleo; allí se une al DNA y desencadena la destrucción del DNA y la muerte celular. En núcleos aislados, el AIF recombinante induce la condensación de cromatina y la fragmentación del DNA en fragmentos de 50 kb, pero no induce la rotura oligonucleosómica

Efectos nucleares

La degradación del DNA cromosómico en fragmentos oligonucleosómicos es una de las características de la apoptosis. La fragmentación del DNA en células apoptóticas fue descrita por Willie en 1980. Estímulos apoptóticos como el etopósido, radiaciones UV o gamma, inducen la fragmentación del DNA que puede detectarse por electroforesis de gel de agarosa y observar las repeticiones de 200 kb en forma escalonada, que corresponden a las proteínas de las histonas en los cromosomas. Como las roturas en la doble cadena de DNA, aunque sean pocas, incapacita a la célula a sufrir mitosis, la fragmentación del DNA puede considerarse como una definición de muerte por apoptosis. Sin embargo, en algunos sistemas apoptóticos inducidos por Fas, se ha observado que las células enucleadas artificialmente pueden morir por apoptosis, lo que demuestra que el núcleo y la cromatina no son siempre necesarios.

La degradación oligonucleosómica del DNA en el núcleo de células apoptóticas se consigue mediante la acción de caspasas activas. El proceso de fragmentación lo realiza una DNasa activada por caspasa, denominada CAD. Cuando CAD se sintetiza, ICAD se une a la cadena naciente de CAD para permitir su correcto plegamiento. ICAD permanece formando complejo con CAD, lo cual inhibe la actividad DNasa de CAD y enmascara su señal de localización nuclear manteniendo a CAD en el citoplasma. Por tanto, en condiciones normales CAD existe como complejo inactivo formando complejo con ICAD (inhibidor de CAD). Cuando el estímulo apoptótico activa las caspasas, incluyendo a la caspasa-3, se rompe la unión ICAD/CAD, y una vez que CAD queda libre puede entrar en el núcleo y actuar como Dnasa con una elevada actividad específica, comparable o mayor que la Dnasa I o Dnasa II, y degrada rápidamente al DNA cromosómico. ICAD no es un inhibidor, más bien es una carabina molecular, porque CAD solo se expresa en presencia de ICAD.

Otros procesos se encuentran en asociación con la CAD para acelerar la apoptosis. Por ejemplo.

- la inactivación de enzimas implicadas en la reparación del DNA,

- la inactivación de enzimas implicadas en la replicación del DNA, y
- la rotura de proteínas nucleares estructurales.

El enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa o PARP, fue la primera proteína identificada como sustrato de las caspasas. PARP está implicada en la reparación del DNA dañado, y funciona catalizando la síntesis de poli(ADP-ribosa), que se une a las cadenas rotas de DNA y modifica a las proteínas nucleares. Esta capacidad de reparar las lesiones del DNA desaparece por efecto de las caspasas.

La DNA topoisomerasa II es un enzima nuclear esencial para la replicación y reparación del DNA. Las caspasas inactivan este enzima y conducen a la lesión del DNA.

Las laminas son proteínas intranucleares que mantienen la forma del núcleo y median interacciones entre la cromatina y la membrana nuclear. La degradación de las laminas por la caspasa-6 origina la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, normalmente observada en células apoptóticas.

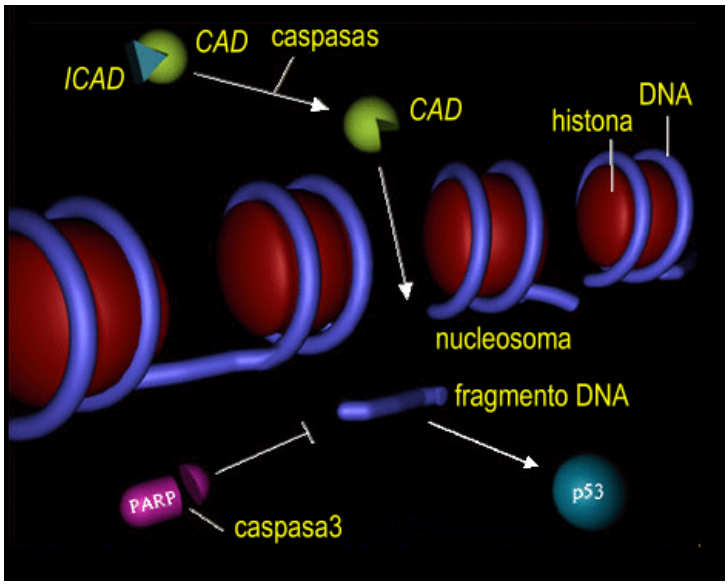

Figura 7.Degradación del DNA.

Activadores e inhibidores de la apoptosis

Siendo la apoptosis un proceso activo y estrictamente regulado, existen diversos activadores (citocromo c, samc/diablo, AIF. BIR3) y reguladores negativos (IAP, Hsp, Bcl-2 y BclXL, etc). La apoptosis puede ser bloqueada por inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas, lo que demuestra que, para su iniciación y progresión, son necesarias una serie de proteínas. El análisis genético del *C. elegans,* ha revelado la existencia de de una serie de genes y proteínas implicadas en el control de la apoptosis.

La activación del apoptosoma se encuentra estrechamente controlada por proteínas de la familia Bcl-2 asociadas a la mitocondria, algunas de las cuales son apoptóticas y otras antiapoptóticas. Las células están protegidas frente a los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (relacionados con CED-9), los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma. Son factores antiapoptóticos la proteína Hsp70 y las IAP. La Hsp70 secuestra Apaf-1 y con ello impide la formación del apoptosoma, y las IAP que bloquean la actividad de las propias caspasas.

La inhibición de la apoptosis es importante en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos superiores. Durante el ciclo de vida normal la proteína inhibidora IAP, tiene una amplia capacidad *antiapoptótica* por silenciar la actividad de las caspasas. IAP fue identificada como proteína vírica que inhibe la muerte celular. Se caracteriza por poseer uno o más dominios muy conservados de 70 aminoácidos que contienen motivos de dedo de zinc, denominados repeticiones baculovíricas (BIR) esenciales para la actividad antiapoptótica. Existen unos cinco miembros de esta familia: cIAP1, cIAP2, XIAP, NAIP y survivina. Su acción es bloqueada por smac/diablo

El miembro prototipo de la familia Bcl-2 es un oncogen, identificado en leucemia humana de células B (B cell leukemia). Existen proteínas Bcl-2 proapoptóticas y antiapoptóticas, lo cual indica que miembros de la misma familia pueden actuar como oncogenes o como supresores de tumores. La familia Bcl-2 se divide en tres grupos según los dominios BH (Bcl-2 homology) que las integran:

1. Antiapoptóticas y oncogénicas, las que comparten homología de secuencia en los dominios BH1, BH2, BH3, y BH4. Ejemplos: Bcl-2 y Bcl-XL;
2. Proapoptóticas, las que comparten la homología de los dominios B1, B2 y B3. Ejemplos Bax y Bak;
3. Proapoptóticas, las que comparten la secuencia de homología solo en el dominio BH3. Ejemplos Bid, Bik y Bim.

Se ha demostrado que el dominio BH4 se requiere para la actividad apoptótica y que el dominio BH3 es esencial y suficiente para la actividad proapoptótica y supresora tumoral

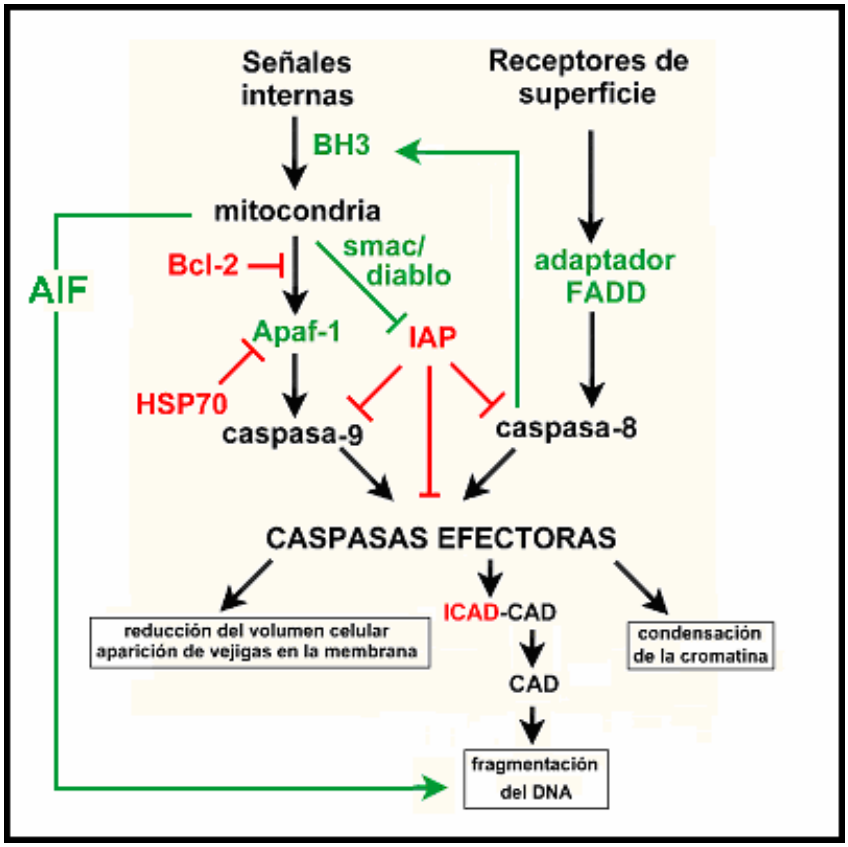

Figura.8. Las células están protegidas por los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2, los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma, por la HSP70, que secuestra el dominio CARD de Apaf-1 y por IAP que actúa sobre las propias caspasas. La mitocondria inicia la cascada apoptótica liberando citocromo c, pero este efecto puede ser anulado si IAP mantiene su efecto inhibidor sobre las caspasas. La señal apoptótica tiene que ser sostenida por la liberación de Smac/diablo . Smac/diablo es la segunda proteína mitocondrial activadora de la caspasa que se une directamente a IAP y antagoniza su función. Un tercer activador de la apoptosis de procedencia mitocondrial es AIF, se traslada al núcleo donde interviene en la condensación de la cromatina..

El suicidio cellular defiende el organismo

La relación entre apoptosis y cáncer fue apreciada por primera vez, hace más de treinta años, por Kerr y sus colaboradores, quienes observaron

que el ritmo del crecimiento de los tumores era muy pequeño si se comparaba con sus índices mitóticos. Cuando se descubrió que otro proceso diferente a la necrosis podía ser responsable de este fenómeno, fue cuando comenzó la "era de la apoptosis". Recientemente es mucho lo que se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos que relacionan apoptosis y cáncer y es ahora posible conectar las actividades de los reguladores de la apoptosis con el desarrollo tumoral. Es un hecho reconocido que las células cancerosas pueden evadir la respuesta apoptótica y sobrevivir para formar tumores. Así que existen ya evidencias que establecen una relación entre algunos genes que intervienen en la regulación de la apoptosis y los que intervienen en el desarrollo del cáncer. Los dos ejemplos más conocidos de estos genes son los que codifican la proteína p53 y los miembros de la familia Bcl-2 (figura 9).

La proteína p53 supresora tumoral es un factor de transcripción que controla el estado del DNA, e inhibe la progresión del ciclo celular si existe alguna lesión en esta molécula. La mutación de p53 se asocia con muchos cánceres humanos y los ratones knocked out en las dos copias de p53 desarrollan numerosas enfermedades malignas.

Una vez lesionado el DNA, por ejemplo por estrés celular, radiación gamma y fármacos genotóxicos, la p53 se eleva y las células en proliferación se detienen en G1. Esto proporciona un lapso de tiempo para que se verifique la reparación del DNA, antes de que se verifique la siguiente ronda de replicación. La parada del ciclo celular está mediada por estimulación de la expresión de la proteína $p21^{CIP1}$, inhibidora de la ciclina quinasa. De mantenerse las concentraciones elevadas de p53 por un prolongado tiempo se desencadena la apoptosis por inducción de la expresión de Bax y las proteínas BH3, Noxa y PUMA, reguladas por p53. Sin embargo, la sobreexpresión de Bcl-2 contrarresta el efecto apoptogénico de p53. Existe alguna evidencia que demuestra que p53 induce la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden estimular la apoptosis mitocondrial.

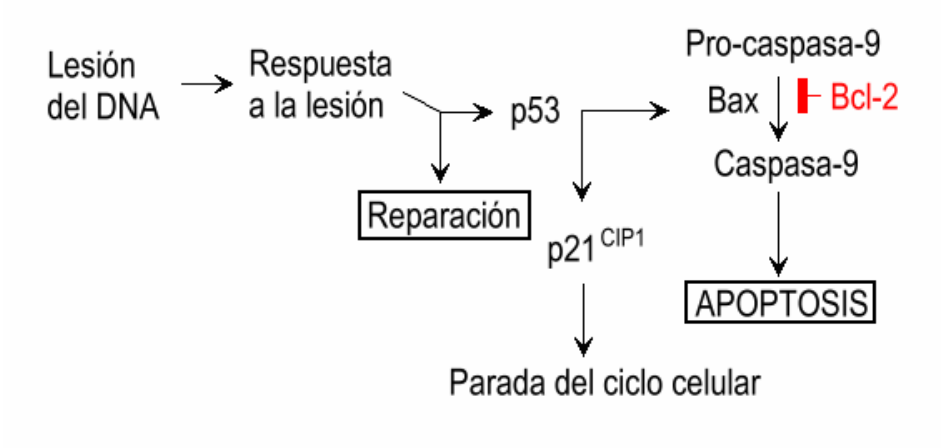

Figura 9. Papel de las proteínas p53 y Bcl-2 en la ejecución de la apoptosis.

CONCLUSIONES

Son hoy ya muchas las evidencias que conectan la apoptosis con la enfermedad. El desafío real ha de tomar esta información y traducirla en efectivas terapias. La terapia relacionada con la apoptosis ha de ser inducir la muerte celular de células no deseadas (por ejemplo, en cáncer), usando la apoptosis como una herramienta eliminadora, o preservar las células irreemplazables (por ejemplo las neuronas) necesarias para mantener la función de un órgano. Los miembros de la via mitocondrial son potencialmente excelentes dianas para terapias inducidas por apoptosis., ya que la mitocondria integra señales de vías de supervivencia (citoquinas, Bad) y de muerte (p53 y Bax). En cada ambiente celular la mitocondria responde de manera apropiada en base a los niveles de influencias presentes, estabilizando la membrana (Bcl-2, Bcl-XL) o distorsionándola (calcio, ROS, BAX). La mitocondria amplifica la respuesta apoptótica liberando inductores apoptóticos con capacidad de iniciar la cascada de las caspasas y la permeabilización de la membrana. Efectores de la apoptosis mitocondrial se encuentran en todos los tipos celulares y parece que se conservan incluso en las células tumorales.. Existe una serie de sustancias que inducen eficientemente la liberación del citocromo c mitocondrial, iones y pequeñas moléculas (calcio, NO, ROS). Finalmente, la

permeabilización de las membranas juega un papel crítico en los mecanismos de diversos agentes quimioterapéuticos y toxinas celulares.

Las terapias apoptóticas dirigidas a la mitocondria pueden ser útiles en enfermedades proliferativas, como el cáncer, sin embargo los agentes que actúan a nivel de mitocondria pueden no ser útiles en terapias donde la prevención de la apoptosis es el objetivo. La mitocondria juega un papel central en la vía apoptótica intrínseca, mientras que la vía apoptótica extrínseca es independiente de la mitocondria. Por tanto, puede ser mas beneficioso bloquear el programa apoptótico en puntos comunes a ambas vías, por ejemplo en las caspazas.

Es un hecho reconocido que la mayor parte de los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular programada y las vías de señalización implicadas en dichos mecanismos, se han conseguido a nivel celular en experimentos *in vitro*. La apoptosis y su interacción con otros procesos, a nivel del organismo, es un problema mucho más complejo. Es imperativo que conozcamos estos mecanismos *in vivo* porque son muchas las enfermedades que se originan como consecuencia de defectos en la regulación de la apoptosis. Una vez que logremos estos conocimientos estaremos capacitados para diseñar estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención y progresión de muchas enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento a los Doctores Evangelina Palaciós Aláiz, Isabel Sanchez Reus y David Andrés García por su inestimable ayuda en la revisión del manuscrito. También agradezco Dolores Velasco Pérez su eficaz colaboración en la preparación del texto y las figuras.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ACEHAN. D. *ET AL.* (2002). Three dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 9: 423-432.

(2) ADAMS, J.M. AND CORY, S. (2001). Life or death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochem. Sci.* 26: 61-66.

(3) ADRIAN, C. AND MARTIN S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochem. Sci.* 26: 390-397.

(4) BAUD, V. AND KARIN, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* 11: 372-377.

(5) BEERE, H. *et al* (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* 2: 469-475.

(6) CHAI, J. *et al.* (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen. Mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* 107: 399-407.

(7) CHAI, J. *et al.* (2001). Structural basis of Caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104: 769-780.

(8) COLEMAN, M.L. *et al.* (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK1. *Nature Cell Biology* 3: 339-345.

(9) DENG, Y., LIN, Y. AND WU, X. (2002). TRAIL induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev.* 16: 33-45.

(10) DU, C. *et al.*, (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.

(11) EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M. AND KAUFMANN, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 383-424.

(12) ELLIS HM Y HORVITZ HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans. Cell* 44, 817-829

(13) FINUCANE, D.M. *et al* (1999). Bax induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X_L. *J. Biol. Chem.* 274: 2225-2233.

(14) JOZA, N., SUSIN, S. A., et al., (2001). Essential role of the mitochondrial Apoptosis Inducing Factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 549-554.

(15) JUIN, P. *et al.* (1999). *c-myc* induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c. *Genes Dev.* 13: 1367-1381.

(16) KERR JF, WYLLIE AH Y CURRIE AR (1972) *Br J Cancer* 26, 239-257.

(17) KORF, I., FAN, Y.A. AND STROME, S. (1998). The polycomb group in *C. elegans* and maternal control of germline development. *Development* 125: 2469-2478.

(18) KUMAR, S. AND COLUSSI, P.A. (1999). Prodomains, adaptors oligomerization: the pursuit of Caspase interaction in apoptosis. *Trends in Biochem. Sci.* 24: 1-4.

(19) MARTINOU JC Y GREEN DR (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 63-67

(20) METZSTEIN, M.M. AND HORVITZ, H.R. (1999). The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Molecular Cell* 4: 309-319.

(21) OLSON M Y KORNBLUTH S (2001). Mitochondrial in Apoptosis and Human Disease. *Curr Mol Med* 1, 91-122

(22) PANDEY, P. *et al.* (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 19: 4310-4322.

(23) RENATUS, M. *et al.* (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease, caspase-9. *PNAS* 98: 14250-14255.

(24) RIEDL, S.J. *et al.* (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800.

(25) SAITO, M. *et al.* (2000). Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nature Cell Biol.* 2: 553-555.

(26) SALEH, A. *et al.* (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol.* 2: 476-483.

(27) SONG, Z. *et al.* (2000). Biochemical and genetic interactions betweeen *Drosophila* caspases and the proapoptotic genes *rpr*, *hid* and *grim*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2907-2914.

(28) STENNICKE, H.R., RYAN, C.A. AND SALVESEN, G.S. (2002). Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends in Biochem. Sci.* 27: 94-101.

(29) STRASSER, A., O'CONNOR, L. AND DIXIT, V.M. (2000). Apoptosis signalling. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 217-245.

(30) SUSIN, S. A., LORENZO, H. K., et al., (1999). Molecular characterisation of mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF). *Nature* 397, 441-446.

(31) SUZUKI, Y., NAKABAYASHI, Y. AND TAKAHASHI, R. (2001). Ubiquitin protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *PNAS* 98: 8662-8667.

(32) VAUX, D.L. AND KORSMEYER, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.

(33) VERHAGEN, A.M. *et al.* (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.

(34) WIDLAK, P. *et al.* (2000). Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease, DFF40 (caspase activated DNase) on naked DNA and chromatin substrates. *J. Biol. Chem.* 275: 8226-8232.

(35) WU, G. *et al.* (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408: 1008-1012.

(36) YANG, X., CHANG, H. AND BALTIMORE, D. (1998). Essential role of Ced-4 oligomerization in Ced-3 activation and apoptosis. *Science* 281: 1355-1357.

(37) YU, J. *et al.* (2001). PUMA induces rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* 7: 673-682

(38) WYLLIE AH, KERR JF Y CURRIE AR (1980). Cell Death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306

GLOSARIO

- **AIF,** (apoptosis inducing factor), factor inductor de la apoptosis que se encuentra en la mitocondria en el espacio intermembranas y sale al citosol en respuesta a una señal apoptótica. Induce la degradación del DNA cromosómico independientemente de las caspasas.
- **APAF-1,** factor activador de las proteasas apoptogénicas. Homólogo de la proteína CED-4 del *C. elegans.*
- **APOPTOSOMA,** complejo oligomérico formado por Apaf-citocromo c y dATP, cuya misión es el reclutamiento y activación de la procaspasa 9
- **Bak y Bak,** miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2
- **Bcl-XL,** miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1
- **Bcl-2,** miembro prototipo de la familia Bcl-2, identificado como producto del proto-oncogen *bcl-2* encontrado en ciertos linfomas de células B. Proteína de 25 kD, reside en la cara citoplasmática de la membrana externa mitocondrial.No promueve el crecimiento celular *per se,* pero promueve la supervivencia celular.
- **BH,** (homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoidales que funcionan como motivos de interacción proteica
- **BH3,** dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.
- **BH4,** dominio antiapoptótico de la familia Bcl-2

- **Bid, Bik y Bim,** miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 que comparten la secuencia de homología sólo en el dominio BH3
- **BIR,** (baculoviral IAP repeat) dominio muy conservado de 70 aminoácidos que es esencial para la actividad antiapoptótica de IAP
- **CAD,** desoxiribonucleasa activada por caspasa (caspase-activated deoxyribonuclease)
- **CARD,** dominio de reclutamiento de las caspasas
- **CASPASAS**, cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzimas proteolíticos que contienen cisteína en su molécula y verifican la proteolisis en lugares previos a aspartato. Se conocen 14
- **CED-4** (cell death determining-4), proteína supresora extragénica de la ganancia de función de la EGL-1
- **ΔΨ,** potencial transmembrana de la membrana mitocondrial interna
- **dATP,** desoxiadenosin trifosfato
- **DD,** dominio específico de muerte situado en la porción intracelular del receptor, que se activa por cuando la unión del ligando extracelular induce la oligomerización (trimerización) del receptor.
- **DED,** dominio efector de muerte. El agrupamiento FADD con DED recluta la procaspasa-8, que también tiene DED en su porción N terminal (que corresponde a la CARD de la procaspasa-9)
- **DOMINIO,** porción discreta de una proteína que se une independientemente al resto de la proteína y posee su propia función. Unidad estructural que puede encontrarse sola o con otros dominios o repeticiones. Relacionada evolutivamente. Se define por su estructura
- **R5,** receptores de muerte a los que se une TRAIL
- **EGL-1,** proteína codifcada por egl-1, el primer gen descubierto de el sistema de la muerte celular programada, como una mutación de ganancia de función, que causa la muerte no programada de dos neuronas que inervan la vulva, produciendo un defecto en la puesta de huevos (egg laying defective)
- **FADD,** dominio de muerte asociado a Fas
- **FAS,** receptor de muerte
- **FASL,** ligando del receptor de muerte Fas

- **GRANDZIMA,** serina proteasa segregada por los linfocitos T
- **IAP,** inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por smac/diablo.
- **ICAD/CAD,** heterodímero inhibidor/desoxiribonucleasa, que para actuar como desoxiribonucleasa activa necesita ser hidrolizado por caspasas para liberar CAD
- **MÓDULO,** elemento compuesto por múltiples motivos en un segmento de contiguas secuencias
- **MOTIVO,** región corta muy conservada en una secuencia proteica. Frecuentemente son partes muy conservadas de dominios
- **MPTPC,** complejo mitocondrial del poro de permeabilidad transitoria
- **NOXA,** proteína BH3
- **PARP,** poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparador del DNA inactivado por las caspasas
- **PUMA,** proteína BH3
- **Smac/DIABLO,** inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la caspasa, /proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP
- **TNF,** factor de necrosis tumoral que se une al TNFR-1
- **TNFR-1**, receptor del TNF
- **TRAIL,** ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF
- **VDAC,** (voltaje dependent anion channel), canal aniónico dependiente de voltaje
- **WD-40,** motivos
- **XIAP,** proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Es un modulador potente de la apoptosis. Posee tres dominios BIR y un motivo dedo de zinc circular. Un solo dominio BIR es suficiente para la actividad apoptótica. Se expresa en la mayoría de los tejidos.